

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P de Odontología

**Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico
de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias
anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis
crónica**

TESIS

para obtener el título de Cirujano Dentista

AUTOR

Reyes Collahuacho Carmen Victoria

Lima – Perú

2010

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal representa un grupo de patologías infecciosas que afectan a las estructuras que rodean al diente y cuando progresa, puede causar destrucción a los tejidos de soporte dentario como ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar, para finalmente ocasionar la pérdida de la pieza dentaria.

En el tratamiento de la periodontitis, los métodos tradicionales incluyen la remoción mecánica de la placa dental supragingival y subgingival además del uso de agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, importante como coadyuvante en la primera fase de la terapia periodontal; sin embargo, se plantea el desafío de buscar nuevas opciones de antibioticoterapia frente al creciente número de cepas resistentes a los antimicrobianos comúnmente usados, así como a las reacciones adversas que estos presentan.

En la actualidad se está investigando el uso de nuevas alternativas de tratamiento, que incluyen productos que provienen de la naturaleza como solución a los problemas médicos y odontológicos.

El propóleo es una sustancia que recolectan las abejas de las resinas de las plantas y la utilizan para sellar herméticamente su colmena e impedir infecciones dentro de ella. Es una sustancia conocida desde hace siglos por las innumerables propiedades que posee, gracias a su compleja composición

química obtenida de la flora de donde las abejas lo recolectan y que varía dependiendo tanto de la ubicación geográfica, como de la estación del año en que se obtuvo. Actualmente la producción de propóleo aún se realiza a pequeña escala, a través de su principal derivado: el extracto de propóleo. La calidad del propóleo varía de acuerdo a la zona de producción, es importante resaltar que en el 2004 se realizó un estudio por López y Ubillus en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) para estandarizar el propóleo del valle de Oxapampa, Departamento de Pasco, denominándolo desde aquel entonces como propóleo peruano.

El objetivo de la investigación es determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, y comparar dicha acción con la clorhexidina al 0,12 %.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

- ❖ **SPERANCA P.A. (2007)**; evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de propóleo (EAP) a concentraciones de 5 %, 10 %, 20 %, 30 % sobre microorganismos de bolsas periodontales. Obtuvo como resultado que el EAP se mostró sensible en todas las concentraciones y sin presentar diferencias significativas tanto en anaerobios facultativos, que presentaron un halo de 16.2 mm. correspondiente al EAP 30 %, como también en microaerófilos, con un halo de 16.12 mm para EAP 30 %.¹

- ❖ **GUEVARA E. y Col. (2002)**; estudiaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo (EEP) brasileño contra seis cepas bacterianas estandarizadas periodontopatógenas (*P. intermedia*, *P. melaninogénica*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis* y *F. nucleatum*), y algunos microorganismos como: *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. Comprobaron que todos los microorganismos fueron susceptibles al EEP, con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,25 ug/ml para *Prevotella*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*; mientras que para *A. actinomycetemcomitans* y *C. gingivalis* la CIM fue de 1 ug/ml.²

- ❖ **DEL RIO P. (2006)**; estudió la actividad biocida *in vitro* del propólis chileno Apiherbal® frente a 35 aislados de *P. gingivalis*, tomados de placa

subgingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. Primero determinó el origen mixto del propóleo, luego halló la concentración inhibitoria mínima con un valor de 83,2 mg/ml necesario para inhibir el 75 % de los microorganismos aislados, y por ultimo evaluó el efecto del alcohol utilizado como solvente del propólis, sobre el crecimiento de *P. gingivalis*, el cual correspondió a 40° y 65° necesario para inhibir la cepa de referencia.³

❖ **OZEN T. y Col. (2010)**; estudiaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo (EEP), recolectado de diferentes regiones de Turquía, contra once bacterias anaerobias estandarizadas que causan infecciones en cavidad bucal. Hallaron que las diversas muestras de EEP fueron eficaces contra todas las bacterias anaerobias probadas; además las bacterias anaerobias Gram-positivos fueron detectados como los más sensibles en comparación con las bacterias anaerobias Gram-negativas; así mismo hubo diferencias en su actividad antimicrobiana, con respecto al origen geográfico de las muestras de propóleo.⁴

❖ **KORU O. y Col. (2007)**; evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de cuatro diferentes regiones de Turquía y una de Brasil, contra nueve cepas anaerobias (*P. anaerobius*, *P. micros*, *L. acidophilus*, *A. naeslundii*, *P. oralis*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *V. párvula*). Demostraron que todos los microorganismos evaluados fueron sensibles a las muestras de propóleo y que la actividad fue mayor en Gram Positivos que Gram negativos.⁵

- ❖ **DUARTE S. (2003)**; estudió el efecto de un nuevo tipo de extracto etanólico de propóleo (EEP) denominado Tipo 6 oriundo del Sur de Brasil y de sus productos químicos fraccionados, sobre la Glucosiltransferasa (GST) y sobre la adhesión y crecimiento de *Streptococcus mutans*. Mediante un análisis microbiológico observó que al final del análisis la acción de la GST es inhibida en un 80 % por el EEP tipo 6, mientras que sus productos fraccionados inhiben el 90 % del cultivo, disminuyendo el crecimiento del *S. mutans* debido a que al inhibir la GST, disminuye la adherencia.⁶

- ❖ **DA SILVA G. (2008)**; comparó la actividad antibacteriana *in vitro* de 2 pastas de extracto de propóleo con y sin alcohol, asociado a hidróxido de calcio contra microorganismos de piezas dentarias deciduas con signos de necrosis y fístula. Las pastas en evaluación fueron: P1: 11 % EEP + (OH)₂Ca y P2: 11 % EP+ (OH)₂Ca; control (+): EEP + Glicol de propileno (CHP) y control (-): EP+ Glicol de propileno. Obtuvo que el halo de inhibición de las pastas con propóleo fue mayor que el control (+) y que P2 fue mayor que P1.⁷

- ❖ **SÁNCHEZ A. (2008)**; evaluó la acción antibacteriana *in vitro* del extracto de propóleo (EP) al 20 % y 40 %, asociado a Hidróxido de calcio. Preparo cultivos con microorganismos Gram (+): *S. aureos*, *S. Saprophiticus*, *E. faecalis* y Gram (-): *P. aeuriginosa* y *E. coli*, luego colocó discos empapados con EP al 20 y 40 % asociados a (OH)₂Ca y también (OH)₂Ca disuelto en suero fisiológico como control (+), incubando por 24 horas y midiendo luego

los halos inhibitorios. Obteniendo que el mayor halo inhibitorio correspondió al $(\text{OH})_2\text{Ca}$ en suero, debido a que la resina contenida en el propóleo pudo ser la causa de obstaculizar la difusión de iones del $(\text{OH})_2\text{Ca}$.⁸

❖ **RODRÍGUEZ M. (2007);** comparó la actividad antibacteriana *in vitro* de cuatro soluciones de extracto de propóleo (50 ug, 100 ug, 200 ug y 500 ug) y el paramonoclorofenol alcanforado, frente a cuatro cepas bacterianas estandarizadas frecuentes en necrosis pulpar (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. anaerobias* y *A. odontolyticus*). Obtuvo que a mayor concentración del EP mayor es el halo de inhibición y que solo en caso de *Porphyromona gingivalis*, la solución de 500 ug presenta un halo (21mm) mayor que el paramono (17mm).⁹

❖ **AWAWDEH L. (2009);** investigó la acción antimicrobiana del propóleo como medicación intraconducto a corto plazo frente a cepas estandarizadas de *E. faecalis*. Preparo disco de dentina de 7 mm de longitud que fueron colocados en tubos de ensayo con CTS inoculados con *E. faecalis* y formo grupos, G1: 20 discos que fueron recubiertos con propóleo 30 %, G2: 20 discos recubiertos con hidróxido de calcio, quedando en incubación por 2 días para luego medir las UFC. Comprobó que las UFC en G1 es igual a cero y que G2 presenta un número significativo de UFC.¹⁰

❖ **ALMIRA - UBILLUS. (2004);** estandarizaron el propóleo del Valle de Oxapampa, Departamento de Pasco (Perú), para su utilización como materia prima a nivel industrial. Tipificaron las características organolépticas

y fisicoquímicas del propóleo en bruto y en solución, tomando como parámetros estándares internacionales oficiales. Determinaron que el propóleo peruano recolectado en el valle de Oxapampa cumple con los parámetros de calidad basadas en la Norma Rusa RST – RSFR – 317–77.¹¹

❖ **TOMAZ R. (2007);** evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de un adhesivo a base de propóleo al 5 %, 10 %, 15 % y 20 %, frente a 7 patógenos orales (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *A. actinomicetemcomitans*, *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *A. israeli*) comparándolo con nistatina frente a hongos y tetraciclinas contra bacterias. Obtuvo que todas las especies en ensayo fueron sensibles a propóleo, en caso de los hongos, *C. albicans* con propóleo al 20 % (26mm) presenta mayor halo que la nistatina (12mm) y en bacterias, el *A. actinomicetemcomitans*, con propóleo 20 % (25mm) presentó también mayor halo que la tetraciclina (12mm).¹²

❖ **DE PAULA A. y Col. (2006);** evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica de extracto de propóleo brasileño (EPB) y sus fracciones, frente a seis especies de *Candida spp.* y diez bacterias patógenas orales Gram positivas y Gram negativas. Todos los microorganismos probados fueron susceptibles a EPB, con una mayor actividad en Gram positivos que Gram negativos. Ninguna de las fracciones ensayadas fue más activo que el extracto, lo que sugiere un efecto sinérgico de los componentes del propóleo para la actividad antimicrobiana.¹³

❖ **EGUIZABAL M. (2007);** comparó la acción antibacteriana del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) y clorhexidina al 0,12 %, contra cepas estandarizadas de *S. mutans* y *L. casei*, mediante el método de difusión en Placa, para enfrentarlas a las soluciones: 0,8 %, 20 % y 30 %, determinando una mayor tendencia de actividad inversamente proporcional a su concentración, que en el caso del *L. casei*; tal acción antibacteriana en las concentraciones 0,8, 20 y 30 % es significativa; así mismo la acción contra *S. mutans* es mayor que en *L. casei*; en concentraciones de 0,8 y 20 %; y también la acción antibacteriana del EEPP al 0,8 % es mayor que la acción de la clorhexidina, tanto para *S. mutans* y *L. casei*.¹⁴

❖ **QUINTERO M. y Col (2008);** estudiaron el efecto antifúngico de cuatro extractos etanólicos de propóleos de tres diferentes estados de México y de cuatro extractos comerciales sobre el crecimiento de *Candida albicans*, de 36 aislamientos clínicos y una cepa estandarizada. Obtuvo que el extracto de Cuautitlan izcalli, presentó la mayor actividad biológica inhibiendo el 94,4 % de los aislamientos clínicos a una CMI de 0,8 mg/ml; mientras que para la cepa de referencia la CMI fue de 0,6 mg/ml. Seguido fueron los extractos de las restantes regiones y finalmente los de origen comercial.¹⁵

❖ **CAIRO do AMARAL y Col. (2006);** evaluaron la eficacia de una formulación de propóleo gel brasileño (BGP), en el tratamiento de pacientes con gingivitis y periodontitis crónica. Seleccionaron cuatro pacientes, y se procedió a dividir los arcos dentarios, el tratamiento consistió en limpieza

dental con BGP y una aplicación de BGP en cada bolsa periodontal una vez por semana, durante 5 semanas. Obtuvieron una regresión de la gingivitis y supuración del 95 % en todos los dientes regados con BGP, así como una reducción en todas las profundidades de la bolsa y movilidad dental.¹⁶

❖ **CARVALHO S. (2007);** estudió el efecto in vivo del extracto de propóleo (EP) sobre *Streptococcus mutans*. Seleccionó 41 pacientes, a los que se les tomó 3 muestras de saliva, la primera tomada 2 horas después de la primera comida del día, luego se realizó enjuagues de 3 ml de EP por 1 minuto, y se repitió esta acción 3 veces al día por 7 días; la segunda muestra 1 hora después del enjuague y la tercera muestra 7 días después. Obtuvo que al comparar la 1ra y 3ra muestra, disminuyó el crecimiento bacteriano en 81 %, aumento un 9,5 % y sin cambios un 9,5 %.¹⁷

❖ **RIBEIRO A. Y Col. (2007);** evaluaron los resultados clínicos y microbiológicos de un enjuague bucal de propóleo en niños con caries dental activa. Dividieron la población en 2 grupos: GP (enjuague bucal) y GF (fluoruro de sodio al 0,2 %), ambos debieron realizar enjuagues con 10 ml por 1 minuto durante 15 días. Tomaron muestras de saliva y registraron los índices de higiene antes y después de los enjuagues. Obtuvieron que el número de UFC y los signos clínicos se habían reducido.¹⁸

❖ **GISPERT E. (2000);** comparó la actividad anticaries de una crema dental que contiene 0,8 de extracto de propóleo blando con una crema dental

placebo. Seleccionó 43 niños entre 7 y 10 años, divididos en 2 grupos, P1 (placebo) de 19 y P2 (propóleo) de 24, los cuales realizaron cepillados durante 18 meses en 10 ciclos. Obtuvo en P1 un aumento del 14,2 % y en P2 una reducción del 85,6 % con respecto al % de afectados, mientras que en relación al índice de caries se observa que P1 disminuyó un 19 % y P2 un 90,2 %.¹⁹

❖ **RODRÍGUEZ V. y Col. (2008);** compararon la eficacia del propóleo gel y de miconazol gel en pacientes diagnosticados con estomatitis sub. protésica. Seleccionaron 30 pacientes, de los cuales 15 recibieron tratamiento con el propóleo gel y 15 con miconazol gel, 4 veces al día por 1 semana y al final del séptimo día fueron evaluados. Observaron la curación de la zona afectada en todos los pacientes y los resultados fueron similares al grupo que recibió miconazol, sin diferencias significativas.²⁰

❖ **RODRÍGUEZ V. (2005);** evaluó el efecto terapéutico del extracto etanólico de propóleo (EEP) al 20 % en la candidiasis oral y la comparó con la nistatina. Seleccionó a 18 pacientes portadores de prótesis que presentaron lesiones en la mucosa bucal y los dividió en 2 grupos, indicándoles a 12 de ellos la aplicación tópica de EEP al 20 % 4 veces al día por una semana y a los 6 restantes la aplicación de nistatina de la misma manera. Los pacientes son reevaluados a la semana, observando la remisión total de las lesiones, similar en ambos grupos.²¹

❖ **FERNÁNDEZ K.I. (2007);** evaluó la eficacia de la tintura de propóleo al 20 % en el tratamiento de la hiperestesia dentinaria (HD). Seleccionó 37 casos de HD leve, 15 de HD moderada y 8 de HD severa, a los cuales aplicó el medicamento (propóleo), diariamente por 72 horas. Observó la remisión de la sintomatología luego de un estímulo mecánico a las 24 horas (23,3 %), a las 48 horas (70 %) y a las 72 horas (100 %); en relación a la eficacia del tratamiento se presentó 61 % en casos leves, 16 % en moderados y 5 % en severos.²²

❖ **OZAN F. y Col. (2007);** compararon los efectos de cuatro enjuagues bucales que contienen propóleo a diferentes concentraciones (1 %, 2,5 %, 5% y 10 %) con un enjuague que contiene clorhexidina (CHX) al 0,2 %, además de los efectos citotóxicos que pueden producir en fibroblastos gingivales. Observaron que sólo el enjuague con propóleo al 10 % presentó actividad biocida frente a *E. coli*, *C. albicans* y *S. aureus*, pero menor a la de CHX. No se observan efectos citotóxicos en los enjuagues con propóleo, pero si en el enjuague con CHX.²³

❖ **MAYORGA I. y Col. (2007);** determinaron la microflora subgingival más frecuente en pacientes con periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA). Seleccionaron a 183 pacientes, divididos en 3 grupos, G1 (84): con P.C., G2 (59): con PA y G3 (40): periodontalmente sanos. Tomaron muestras de 6 sitios con mayor profundidad de sondaje para identificar los microorganismos y calcular las UFC por ml de muestra.

Obtuvieron para G1: *P. intermedia*/*P. nigrescens* se halló en un 72,6 % en comparación con *P. gingivalis* (60,7 %); G2: *P. intermedia*/*P. nigrescens* (74,6%) y *A. actinomicetemcomitans* (67,9%); G3: nuevamente *P. intermedia*/*P. nigrescens* (45 %) mayor que *P. gingivalis* (7,5%).²⁴

❖ **GUILARTE C. (2005)**; seleccionó 30 pacientes con periodontitis crónica (G1) y 15 periodontalmente sanos (G2). En ambos grupos tomó muestras de bolsas periodontales o placa subgingival y realizó el aislamiento de bacterias anaerobias mediante cultivos por 7 a 10 días. Obtuvo que para G1, el microorganismo más frecuente fue *Prevotella intermedia* (36,66 %) seguido de la *P. gingivalis* (30 %) y en menor número se halla *T. forsythensis* (3,33 %). Para el G2, solo en caso de 4 pacientes se observó crecimiento bacteriano y este corresponde a la *Prevotella intermedia*.²⁵

❖ **CABRERA M.Y. (2007)**; determinó la relación entre la cantidad de *Prevotella intermedia* en el surco gingival de mujeres gestantes y los diferentes grados de placa bacteriana que ellas presentan. Seleccionó a 138 mujeres gestantes a las cuales realizó IHO de Green-Vermillón y tomó muestras de fluido crevicular de surco gingival. De los resultados se encontró que cuanto mayor fue el grado de placa bacteriana, mayor fue el crecimiento de esta bacteria en el surco gingival de las gestantes.²⁶

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL

2.2.1.1 DEFINICIÓN

El periodonto está constituido por los tejidos de protección y apoyo del diente; se compone de encía (periodonto de protección), ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar (periodonto de inserción); estos tejidos están sujetos a variaciones morfológicas y funcionales, así como a cambios motivados por la edad.²⁷ La función principal del periodonto, también conocido como "aparato de inserción" o "tejido de sostén", consiste en unir al diente con el tejido óseo del maxilar y la mandíbula a través del ligamento periodontal, al igual que mantener la integridad de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal.²⁸

Las enfermedades periodontales son lesiones con características inflamatorias causadas por una infección por placa bacteriana y/o patógenos específicos. Existen dos grandes cuadros: gingivitis, la cual corresponde a una respuesta inflamatoria del tejido gingival frente a la acumulación de placa bacteriana, y periodontitis, que corresponde a una patología infecciosa, de tipo específica, con características inflamatorias que afecta los tejidos de soporte dentario.²⁹

Esta enfermedad, a diferencia de la gingivitis, se caracteriza por una pérdida estructural del aparato de inserción, producida por determinadas bacterias, éstas son también necesarias pero no

suficientes para que se produzca la enfermedad, siendo necesaria la presencia de un hospedador susceptible. Desde el punto de vista histológico, las características que podemos hallar son bolsas periodontales, localización de la unión epitelial apical a la línea amelocementaria, una pérdida de fibras colágenas, una elevada concentración de leucocitos polimorfonucleares en la unión y bolsa epitelial, y una migración del infiltrado celular inflamatorio hacia el tejido conectivo.³⁰

2.2.1.2 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Durante muchos años, la Asociación Americana de Periodoncia ha clasificado las enfermedades periodontales en gingivitis y periodontitis, en función de la región periodontal afectada. En 1997, la Asociación Americana de Periodoncia decide formar un comité encargado de esta tarea, y es en el *International Workshop for a Clasification of Periodontal Diseases and Conditions* (1999) cuando se aprueba la clasificación propuesta por dicho comité.³¹

- Enfermedades Gingivales
 - Inducidas por placa
 - No asociadas a placa bacteriana
- Periodontitis crónica
 - Localizada
 - Generalizada
- Periodontitis Agresiva

- Localizada
- Generalizada
- Periodontitis como Manifestación de Enfermedades Sistémicas
 - Asociada a desórdenes hematológicos
 - Asociada a desórdenes genéticos
 - No especificados.
- Enfermedades Periodontales Necrotizantes
 - Gingivitis ulcerativa necrotizante (GUN).
 - periodontitis ulcerativa necrotizante (PUN).
- Abscesos del Periodonto
 - Absceso gingival.
 - Absceso periodontal.
 - Absceso pericoronal.
- Periodontitis Asociada a Lesiones Endodónticas
 - Lesiones combinadas perio-endo.
- Condiciones y Deformidades Adquiridas o del Desarrollo
 - Factores localizados relacionados con el diente que modifican o predisponen la presencia de enfermedades periodontales.
 - Deformaciones y condiciones mucogingivales alrededor de los dientes.
 - Condiciones y deformidades mucogingivales en crestas desdentadas
 - Trauma oclusal

2.2.1.3 PERIODONTITIS CRÓNICA

A. HISTORIA

En los últimos años la Asociación Americana de Periodoncia ha realizado diversas clasificaciones de las enfermedades periodontales, que han ido cambiando en función de nuevos conceptos sobre la enfermedad periodontal.

Entre diversas clasificaciones que se realizaron a lo largo de los años, cabe destacar la de Page y Schroeder en 1985, en la que describieron en su libro de "Periodontitis in man and other animals" los diferentes tipos de periodontitis.

En 1989 se reúnen un grupo de especialistas en el tema para llegar a un consenso sobre las clasificaciones de la enfermedad periodontal, tomando como referencia la de Page y Schroeder; y a través del World Workshop de 1989, se denominó periodontitis de Adulto a aquel paciente que presentaba enfermedad periodontal a partir de los 35 años, con reabsorción ósea lenta y predominantemente horizontal. Unos años más tarde, en Europa se llega al consenso de otra nueva clasificación en el European Workshop de 1993, en el que la periodontitis del adulto está descrita como un factor primario, y no es hasta el World Workshop de 1999 que se sustituye por el nombre de periodontitis crónica ya que esta enfermedad puede ocurrir sobre un rango muy variable de edades y a pesar de su ritmo generalmente lento de progresión, algunos individuos presentaban periodos cortos de exacerbación.²⁹

B. DEFINICIÓN

Enfermedad infecciosa que resulta en inflamación de los tejidos de soporte dental, pérdida de inserción progresiva y pérdida ósea, caracterizada por la formación de bolsas y/o recesiones gingivales, que se puede presentar a cualquier edad y puede afectar un número variable de dientes, mostrando diferentes rangos de progresión.³²

C. EPIDEMIOLOGÍA^{32, 33}

Existen pocos estudios epidemiológicos a nivel de América Latina sobre la prevalencia de periodontitis crónica propiamente dicha, debido al cambio de nomenclatura realizada en el World Workshop de 1999. Sin embargo podemos resaltar los siguientes estudios:

Brasil:

Cortelli et al (2002), evaluaron periodontalmente 600 individuos de 15-25 años en Taubaté. Los resultados mostraron que el 45 % de los individuos presentaban algún comprometimiento periodontal y el 5 % presentaron periodontitis en su forma más avanzada.

Susin et al, 2005, evaluaron la frecuencia y extensión de la pérdida de inserción en 853 individuos entre 30 y 103 años. Los resultados mostraron que aproximadamente el 79 % y el 52 % de los individuos presentaban respectivamente pérdida de inserción ≥ 5 mm y ≥ 7 mm.

Venezuela:

Ortiz (2000), examinó 214 niños de 6 a 13 años utilizando el índice periodontal de Russell. La autora observó que sólo el 27 % de la muestra exhibió algún comprometimiento periodontal.

En Santiago, Chile:

López et al (2001), hicieron un estudio con 9,162 estudiantes entre 12 y 21 años. Los autores observaron que se localizó una pérdida de inserción clínica ≥ 3 mm, respectivamente, en el 69,2 %, 16 % y 4,5 % de la muestra.

En México:

Carrillo et al (2000), utilizaron el índice de Ramfjord para la evaluación periodontal de 361 individuos. Los resultados demostraron que en los grupos con edades a partir de los 40 años, el 38,8% de los individuos mostró señales de periodontitis desde leve hasta grave.

Borges-Yáñez et al (2006), estudiaron una población de 473 individuos. Los autores observaron que el 28 % de la muestra presentó periodontitis moderada con por lo menos 2 sitios con pérdida de inserción ≥ 4 mm y el 11 % presentó periodontitis grave.

En Perú, Lima:³⁴

Otero J. y Proaño D. realizaron un estudio para determinar la prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y su

consecuente necesidad de tratamiento en 263 varones entre 17 y 21 años que ingresaron en el año 2000 al servicio militar en Lima.

La prevalencia de los hallazgos fue como sigue: de cálculos dentarios fue de 77,4 %, de profundidad al sondaje (entre 4-5 mm) fue de 22,4%, hemorragia al sondaje de 0,4%, pérdida de fijación entre 4-5 mm fue de 21,5 % y ≥ 6 mm fue de 1,1 %.

D. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

El modelo actual establece que las bacterias periodontopatógenas al ingresar disparan una cascada de de respuestas en el hospedero. Una respuesta inmediata es el reclutamiento y migración de leucocitos PMNs al sitio de infección periodontal. Si estas células inflamatorias son capaces de contener y eliminar los patógenos causales y sus productos (como el LPS o lipopolisacarido de las bacterias gran negativas) vía fagocitosis y mecanismos de eliminación intracelular, la enfermedad se limita a gingivitis. Si estos mecanismos fallan y los patógenos o sus productos penetran los tejidos del hospedero, la enfermedad se convierte en periodontitis. El eje monocitario-linfocitario del hospedero se estimula y localmente libera mediadores inflamatorios, estos mediadores inflamatorios a largo plazo causan destrucción tisular local y clínicamente se establece con la formación de la bolsa periodontal y la pérdida de hueso alveolar.²⁸

E. TRATAMIENTO

La Academia Americana de Periodoncia en el 2005-2006 aconsejó el seguimiento de una serie de pautas para el tratamiento de la periodontitis crónica:

- Tratamiento mecánico: Raspado supra y subgingival.
- Instrucciones de higiene oral.
- Raspado y alisado radicular.
- Reevaluación.
- Cirugías: terapia resectiva, regenerativa y mucogingival.
- Estricto programa de mantenimiento.

Además menciona que se puede optar por diagnóstico microbiológico y la prescripción de un antimicrobiano (antiséptico y antibiótico) adecuado.

Rodríguez E. y col, en el 2009,³⁵ resumen en la tabla II, las bacterias implicadas en la periodontitis y a continuación detalla las opciones terapéuticas para ella:

Microorganismos implicados en las infecciones odontógenas y opciones

terapéuticas

PROCESO	LOCALIZACIÓN	BACTERIAS IMPLICADAS	OPCIONES TERAPEÚTICAS
Periodontitis	Tejidos de sostén del diente (periodonto)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythensis</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Streptococcus spp</i>	Tartrectomía Clorhexidina 0,2% tópica o clindamicina/ minociclina gel tópico AB cuando está indicado (Tabla III) - Amoxicilina + clavulánico - Metronidazol - Clindamicina

2.2.2 RELACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA PLACA CON LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

2.2.2.1 CONCEPTO DE BIOFILM Y LA PLACA SUBGINGIVAL

Esta biopelícula o recientemente llamado Biofilm están formados por una o más comunidades de microorganismos embebidos en un glicocálix, unidos a una superficie sólida. La razón por la que existen los Biofilm en la naturaleza es que permiten a los microorganismos unirse y multiplicarse sobre distintas superficies. Además, las bacterias que forman parte de un biofilm (sésiles) disfrutan de un gran número de ventajas en comparación con las bacterias aisladas (plantónicas). Este biofilm se caracteriza por adoptar una estructura diferente a las de localización supragingival y radicular que sólo se adhieren a la superficie dental.³⁷

La placa subgingival está localizada a nivel del espacio virtual del surco gingival y constituida principalmente por una flora bacteriana proteolítica gram negativa, que forma un biofilm y transforma el espacio virtual en auténtica bolsa, con la consecuente destrucción del hueso alveolar. El desarrollo de la placa subgingival se lleva a cabo según el clásico esquema de colonización, sucesión y asociaciones microbianas de Socransky, en la cual se describen 5 grupos de acuerdo a las asociaciones que entre ellas se establecen a la hora de colonizar el surco periodontal.³⁶

2.2.2.2 MICROORGANISMOS ASOCIADOS

En la periodontitis crónica, los microorganismos principalmente implicados son *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. loescheii*, *P. oralis*, *Tanarella forsythensis*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *Treponema sp*, y en menor proporción *P. micros*, *P. anaerobius* y *E. brachy*³⁷

Diversos estudios describen la microflora más frecuente en esta enfermedad, así tenemos: Guillarte en el 2007 realizaron un estudio a fin de determinar la presencia de bacilos Gram negativos en 30 pacientes con periodontitis crónica. Las especies detectadas en este estudio fueron: *Prevotella intermedia* (36,66 %), *Prevotella melaninogénica* (6,66 %), *Prevotella loescheii* (16,66 %), *Porphyromonas gingivalis* (30,99 %), *Fusobacterium nucleatum* (3,33 %) y *Bacteriodes sp.* (3,33 %).²⁵

Mayorga I. y col en el 2007, determinaron la microflora Subgingival en periodontitis crónica y agresiva de 183 pacientes; detectándose en ambos casos una alta y similar frecuencia de *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *Fusobacterium spp* y *E. corrodens*, y en menor grado *A. actinomicetencomitans*, el cual fue mayor en el grupo de *P. agresiva*.²⁴

PRINCIPALES MICROORGANISMOS

***Porphyromonas gingivalis*³**

- **Descripción:** *P. gingivalis* es una especie de bacilos Gram negativo pequeño (cocobacilos), no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, que forma colonias uniformes de coloración verdosas, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular y con un diámetro de 0,5-0,8 µm por 1,0-3,5 µm de largo.
- **Taxonomía:** Las especies anteriormente estuvieron ubicadas dentro del Género *Bacteroides*, pero debido a su heterogeneidad genética paso a formar parte de esta nueva denominación. Actualmente el Género *Porphyromonas* comprende 12 especies, pero solo tres se han aislado de la cavidad bucal del hombre, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *P. asaccharolytica*.
- **Nutrición:** *P. gingivalis* coloniza sitios en los cuales hay substratos abundantes en nitrógeno, con un requerimiento obligado de hierro para crecer. Sin embargo, cuando ocurre una falta de hierro utiliza hemina. Los niveles de hemina en boca son variables y el sangramiento gingival, puede ser un factor que predispone su presencia.
- **Factores de virulencia:** Se ha demostrado que esta bacteria posee elementos estructurales que favorecen su virulencia como: Fimbrias, residuos proteicos, glucídicos y de lipopolisacáridos, que intervienen en el proceso de adhesión a tejidos del hospedero y en la coagregación bacteriana; hemaglutininas, que participan en la aglutinación de hematíes en los inicios de la colonización tisular;

cápsula, cuya acción es fundamentalmente antifagocítica; Vesículas superficiales, que participan en la captación de nutrientes. También produce una variedad de enzimas como colágenas que actúa sobre el colágeno del ligamento periodontal y hueso alveolar; hialuronidasa, que actúa sobre el ácido hialurónico del tejido favoreciendo la difusión del microorganismo; fosfatasa ácida y alcalina, que determinan la pérdida del hueso alveolar.

Género *Prevotella*²⁶

- **Descripción:** son bacilos cortos, pleomórficos, generalmente de 0,4 um por 0,6 a 1 um de longitud, inmóviles, no esporulados. Capaces de producir pigmentos, moderadamente fermentativos. **Taxonomía:** anteriormente fueron clasificadas dentro del Género *Bacteroides* y de acuerdo a la producción de pigmento marrón oscuro o negro se clasifican en dos grupos: 1) Especies pigmentadas: *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. corporis*, *P. nigrescens*, *P. pallens*, y, 2) Especies no pigmentadas: *P. bivia*, *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. disiens*, *P. oralis*, *P. oris*, *P. oulorum*, *P. veroralis*, *P. heparinolytica*, *P. zoogloformans*.
- **Nutrición:** Las colonias crecen en un medio de agar sangre anaerobio y requiere de vitamina K o hemina para desarrollarse y proliferar. Cabe señalar que las especies de *Prevotella* utilizan carbohidratos como fuente única de carbono y energía.

- **Factores de virulencia:** se han descrito fimbrias, como adhesinas, que intervienen en la adhesión y coagregación bacteriana. También se ha comprobado su capacidad para degradar inmunoglobulinas, su acción tóxica sobre fibroblastos, su actividad fibrinolítica, y el estímulo de su crecimiento por hormonas como estradiol y progesterona. Igualmente, se ha demostrado *in vitro* que *P. loescheii* y *P. melaninogenica* tienen efecto inmunosupresor por inhibir la proliferación de linfocitos B e inmunoglobulinas.

Tanarella forsythensis³⁸

- **Descripción:** Son bacilos pequeños, muy parecidos a la *Porphyromonas* y *Prevotella*, por lo tanto inmóviles, anaeróbicos estrictos, capsulados, fimbria dos, endotoxigénicos, colagenolíticos, pero son buenos fermentadores de azúcares, y no sensibles a las sales biliares al 20 %. Se han aislado más de lesiones periodontales activas, que de inactivas y se las relacionan con las periodontitis crónicas refractarias
- **Nutrición:** Su crecimiento *in vitro* es difícil, sin embargo, el desarrollo de sus colonias en placas de agar sangre es favorecido por la presencia de N-acetilmuramato, hemina y vitamina K
- **Factores de virulencia:** entre los factores de virulencia tenemos las endotoxina, la producción de neuraminidasa (degrada el ácido neuramínico de la mucina, lo cual licua el moco, (nasal o salival), y

permite la invasión hacia las células epiteliales), enzimas tríplicas, con especificidad sobre proteínas con residuos de arginina.

Actinobacillus actinomycetemcomitans³⁹

- **Descripción:** es un coco o bacilo corto, gramnegativo, inmóvil, sacarolítico, anaeróbico facultativo, capnófilo (requiere CO₂ para su desarrollo), crece muy bien en medios que contengan sangre o suero y están muy aumentados en pacientes con periodontitis agresivas y algunas formas crónicas, sobre todo las refractarias.
- **Taxonomía:** Existen hasta ahora 5 serotipos de esta especie en base a diferencias en su pared bacteriana (a, b, c, d y e), siendo el más patógeno, el tipo b.
- **Factores de virulencia:** Entre los factores de virulencia, posee endotoxina, fimbrias, produce leucotoxina, epiteliotoxina, collagenasa, factores inhibidores de la función leucocitaria, proteasas como complementasa, factores inmunosupresores (activan a los linfocitos T8 o (supresores), factor activador policlonal de linfocitos B (una interleuquina), factores inhibidores de fibroblastos, de células epiteliales y endoteliales, y otros factores que juegan algún papel en la génesis de las infecciones periodontales.

Fusobacterium nucleatum

- **Descripción:** es un bacilo grande, fusiforme (con extremos puntiagudos), gramnegativo, fimbriado, anaeróbico estricto, inmóvil, no fermentador, no capsulado y generalmente no fermentativo. La producción de ácido butírico como principal producto metabólico permite diferenciar *Fusobacterium* de *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Bacteroides*.
- **Taxonomía:** Se han descrito hasta los momentos cinco subespecies de *F. nucleatum*: *F. nucleatum nucleatum*, *F. nucleatum polymorphum*, *F. nucleatum fusiforme*, *F. nucleatum vincentii* y *F. nucleatum animalis*. De ellas *F. nucleatum nucleatum*, es significativamente frecuente en la periodontitis.
- **Factores de virulencia:** su papel patógeno no parece muy claro debido más que todo a sus escasos factores de virulencia, como lo son la presencia de fimbrias, producir endotoxinas débiles, adhesinas y un factor soluble inhibidor de la quimiotaxis leucocitaria.

2.2.3 PROPÓLEO

2.2.3.1 HISTORIA

El uso del propóleo por el hombre data desde tiempos muy remotos, los sacerdotes del antiguo Egipto la utilizaban muy frecuentemente

como sustancia medicinal y como parte integrante de los ungüentos y cremas de embalsamar. El sabio Aristóteles (384 – 322) confeccionó una colmena transparente para estudiar la vida de las abejas y éstas se lo impidieron cubriendo las paredes con una sustancia oscura. En sus escritos él cita al propóleo como el “remedio ideal para golpes y magulladuras”, y fueron precisamente los griegos quienes le dieron el nombre de "propóleos": pro que significa "defensa o delante " y polis que quiere decir ciudad, ósea “defensa de la ciudad de las abejas”.

Galeno en el siglo II, menciona al propóleos en sus trabajos, y el famoso médico y filósofo persa Avicena, en el siglo XI, dice del mismo: "Tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas, vivifica, limpia fácilmente y ablanda fuertemente."

En el primer libro médico, libro de preparación de medicamentos para todas las partes del cuerpo humano, escrito en el período de Ebers (1700 AC) se menciona la cera y el propóleos como medicinas, a partir de entonces el propóleos se usó por casi todas las civilizaciones, China, India, Romanos, Persas, los Incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y en el continente europeo lo usaron los franceses en los siglos XVIII y XIX para el tratamiento de llagas.

Cuando se descubre la penicilina y demás antibióticos se olvidan del propóleos, pero por los efectos adversos que estos causan a la salud se redescubre el propóleos, con múltiples aplicaciones.

Su utilización se ha mantenido durante siglos hasta nuestros días, en que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de propóleos en los campos de la biología, la medicina humana y la medicina veterinaria.¹¹

2.2.3.2 DESCRIPCIÓN GENERAL^{11, 14}

Se denomina propóleo a una mezcla de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, recogidas de ciertas plantas como: las coníferas (pinos, abetos, cedro), frutales (ciruelo, cerezo, manzano, mango, palto, peral), algarrobo, álamo, acacia, sauce, eucalipto, pequeños arbustos y herbáceas. Siendo el origen primario la existencia de estímulos de búsqueda dado por necesidades en la colmena.

Existen diversas razas de abejas productoras de propóleo en especial las abejas *Apis mellifera*, que transportan las sustancias en el último par de patas dentro de los cestillos de polen. Los compuestos identificados en el propóleo provienen de tres fuentes: exudados de plantas colectadas por las abejas, sustancias segregadas por el metabolismo de las abejas y materias que han sido introducidas durante su elaboración.

Las abejas emplean el propóleos con diversos fines:

- Para tapizar el interior de la colmena evitando su contaminación.
- Reforzar tabiques, paredes y todo aquello que sea inestable.

- Sellar las grietas evitando que se formen corrientes de aire.
- Evitar las vibraciones de las colmenas.
- Amortiguar los sonidos intensos.
- Mantener estable la temperatura de la colmena (30° C)
- Mantener estable el nivel de humedad.
- Momificar y aislar los cadáveres de aquellos enemigos que hayan penetrado en la colmena.

Existen dos teorías sobre la procedencia del propóleo elaborado por las abejas. Una teoría dice que es recolectado por las abejas de más de 15 días que, con sus mandíbulas, toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas y árboles, para almacenarla en los cestitos del polen. Las enzimas de su boca participan también en la operación para evitar su adherencia.

Otra teoría sobre el origen del propóleo manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino medio.

2.2.3.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS^{3, 11, 14}

Estas características constituyen las propiedades primarias de esta sustancia:

- **Aspecto:** Esferas, granos, briquetas. Existe una estrecha relación con el método de cosecha empleado.

- **Estructura:** Espesa, no homogénea, presencia de impurezas mecánicas y de cera, el cual depende del método de cosecha, pero no debe ser excesivo.
- **Color:** Verde oscuro, amarillo, amarillo-verdoso, pardo, pardo-rojizo, pardo oscuro, hasta negro.
- **Consistencia:** A temperaturas superiores a 30°C es blando y menores de 15°C duro y quebradizo.
- **Olor:** Resinoso, aromático, denota la presencia de aceites esenciales y miel en el producto. Pero también existen Propóleos inodoros.
- **Sabor:** Generalmente amargo, picante e insípido en raras ocasiones.

En cuanto a sus características físicas, el propóleo se presenta como un producto sólido, su punto de fusión oscila desde 59°C hasta 70 u 80°C. Presenta una baja solubilidad en agua pero puede ser diluido en solventes como alcohol etílico, acetona, propilenglicol, benceno y soda cáustica; siendo el alcohol etílico el solvente más recomendado ya que permite extraer con más eficiencia los principios activos y bajas concentraciones de cera.

2.2.3.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química del propóleo es sumamente compleja, cada región presenta condiciones de flora diversa, dependiente de

fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa y brillo solar.

En líneas generales en todos los propóleos encontraremos:

Composición promedio del propóleo ³

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.
Ceras	7.55 a 35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb.. Cetonas Lactonas Quinonas Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas: B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ . Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen. Azúcares.

Actualmente gracias al empleo de técnicas más sofisticadas para la identificación de los componentes del propóleo, se ha podido identificar los siguientes compuestos orgánicos.¹⁴

- 27 aminoácidos
- 21 ácidos grasos y sus ésteres
- 56 ácidos aromáticos y sus ésteres
- 9 alcoholes
- 7 aldehídos
- 11 azúcares
- 6 cetonas

- 4 esteroides
- 23 hidrocarburos
- 15 terpenoides y otros compuestos
- 44 flavonoides:
 - Flavononas: pinostrobin, sakuranetin.
 - Flavonas: acacetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocrisina.
 - Flavonoles: apigenin, tt-farnesol, galangina, izalquinina, kaempferol, quercetin, rhamnetin.
 - Flavononoles: pinobanksin.

2.2.3.5 PROPIEDADES DEL PROPÓLEO ^{40, 41}

- **Antibacteriano:** Importante actividad sobre Gram positivo como Gram negativo, en particular con *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Streptococcus mutans*. Los principales responsables son los flavonoides: Galangina y Pinocembrina.
- **Fungicidas:** Por su acción antimicótica se han obtenido excelentes resultados en micosis cutáneas, bucales e incluso genitales causadas por *Cándida albicans*.
- **Antiviral:** El propóleo inactiva los virus de herpes simple tipo 1 y 2. Los flavonoides como apigenina, acacetina y pectolinarigenina que

están presentes en las yemas del álamo y del abedul están relacionados a esta actividad.

- **Antiinflamatoria y Analgésica:** Esta propiedad se debe a la presencia de flavonoides como, galangina. Este compuesto es capaz de inhibir la ciclooxigenasa (COX) y la actividad lipooxigenasa. Otro compuesto, el éster fenetil ácido caféico (CAPE), también presentes en el propóleo, muestra actividad antiinflamatoria inhibiendo la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular, lo que conduce a la supresión de la COX-1 y COX-2.
- **Antioxidante:** Se debe a su actividad antiradicalaria y al efecto inhibidor sobre el ión cuproso. La capacidad antioxidante del propóleo se debe principalmente a los compuestos fenólicos y los flavonoides que contienen.
- **Antitoxica:** la galangina, flavonoide que abunda en el própolis, con propiedades antioxidantes y capaces de modular la actividad enzimática y de suprimir la genotoxicidad de muchos productos químicos, se ha propuesto para la prevención del cáncer.
- **Actividad cicatrizante:** favorece la cicatrización, ya que estimula la regeneración epitelial y la microcirculación, por ello, desde la antigüedad se utiliza junto con la miel y en forma de apósitos o vendajes oclusivos, en el tratamiento de heridas y lesiones ulcerosas de diferente etiología, incluso para la lepra.

2.2.3.6 MECANISMO DE ACCIÓN

La actividad antimicrobiana del propóleo es mayor contra las bacterias Gram-positivas que las gram negativas. Se sugiere que esta capacidad se debe a la acción de flavonoides como: pinocembrina (flavonone) y galangina (flavonoles), así como también del fenil éster del ácido cafeico, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la RNA polimerasa bacteriana. El mecanismo de acción de la galangina, consiste además en degradar la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que conduce a una pérdida de iones de potasio, provocando autólisis de la célula. La quercetina, aumenta la permeabilidad de la membrana, y disipa su potencial, haciendo que las bacterias pierdan su capacidad de motilidad, transporte de membrana y síntesis de ATP, haciéndolas más vulnerables al ataque inmunológico y potenciando a los antibióticos. Mientras que la capacidad antibacteriana de los flavonoides es clara, no parece haber una causa específica, lo que sugiere que hay un efecto combinado o sinérgico en el trabajo.⁴²

2.2.3.7 REACCIONES ADVERSAS

Las reacciones adversas a la aplicación local de propóleo son escasas y se refieren generalmente a reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo dermatitis de contacto. Se han descrito hasta la fecha un total

de 250 casos de alergias por dermatitis de contacto al propóleo. Los reportes generalmente se describen con dermatitis en las zonas palmares y dedos, correspondiente a la manipulación de partes de la colmena que contienen propóleo, o bien, se han visto reacciones alérgicas en la mucosa oral, mucositis orales agudas con ulceraciones, debido a la ingesta de grageas o gotas de propóleo. El principal agente sensibilizante descubierto en la composición de propóleo corresponde a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletil cafeato. Posiblemente existan otros alérgenos no descubiertos a la fecha.³

2.2.3.8 USO DE PROPÓLEO EN MEDICINA

En Medicina humana se han encontrado resultados positivos al usar propóleos en el tratamiento de procesos tales como catarrros de las vías respiratorias altas, gripe, sinusitis, otitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica, tuberculosis pulmonar. Promueve la reconstrucción de colágeno y elastina, pro-oxidante. En el aparato digestivo: insuficiencias hepáticas de etiologías diversas, actúa como espasmolítico. Aparato genito-urinario: infecciones e inflamaciones en general. En alergología para tratar asma bronquial y rinofaringitis-laringitis alérgicas. En ginecología en micosis vaginal y parasitosis. En oftalmología, en glaucoma y cataratas incipientes y tiene gran efecto en casos de queratitis herpética y conjuntivitis de distintos tipos. En el área dermatológica es donde más aplicaciones encuentran,

principalmente para procesos tales como abscesos, forúnculos, supuraciones diversas, sabañones, grietas, verrugas, callosidades, eczemas y psoriasis, entre otros. Por sus propiedades regenerativas y antioxidantes es comercializado en la industria cosmética para ser incluido en formulaciones de cremas regenerativas para piel madura o dañada, cremas antiarrugas, cremas para piel grasa propensa al acné, en productos para contorno de ojos, productos solares, para el cuidado del cabello en general y sobre todo para cabellos finos que tienden a quebrarse.¹¹

2.2.3.9 USO DE PROPÓLEO EN ODONTOLOGÍA

Algunos autores plantean la utilización del propóleo en la odontología como agente antibacteriano para el control de la placa o en el tratamiento de diversas infecciones que se puedan presentar en la cavidad oral, ya que se ha comprobado su capacidad bactericida y bacteriostática frente a bacterias orales.

Acción sobre el *Streptococcus mutans*, mediante los estudios de Eguizábal M. (2007)¹⁴, Carvalho S. (2007)¹⁷ y Duarte S. (2003)⁶; que determinaron la eficacia del propóleos al inhibir *in vitro* a la enzima Glucosiltransferasa que constituye un factor de virulencia asociado con caries dental.

En el área de prótesis, tenemos que Rodríguez V y col. (2008)²⁰, compararon la eficacia del propóleo y miconazol en pacientes con Estomatitis subprotésicas, demostrándose la eficiencia del primero como alternativa de tratamiento. Además Tomaz R. (2007)¹², evaluó la formulación de adhesivos conteniendo propóleo, frente a diversos microorganismos orales, atribuyendo propiedades biocidas al propóleo y sugiriendo el uso de estos materiales para prevenir enfermedades propias de pacientes portadores de prótesis.

En el campo de la endodoncia se han realizado diversos estudios como el de Rodríguez M. (2007)⁹, quien comparó la actividad antibacteriana del propóleo al 5 % y el paramonoclorofenol alcanforado, frente a cuatro bacterias frecuentes en necrosis pulpar, demostrando que ambas tuvieron actividad similar. Da Silva G. (2008)⁷, realizó un estudio comparando la actividad antibacteriana de 2 pastas de extracto de propóleo asociado a Hidróxido de calcio, determinando que las pastas conteniendo propóleo presentan mayor actividad biocida frente a microorganismos de piezas dentarias con signos de necrosis y fistula. También Awawdeh I. (2009)¹⁰ estudio el efecto del propóleo como medicamento intraconducto y lo comparó con $(OH)_2 Ca$, reafirmando la eficacia en el tiempo y la acción del propóleo frente a *E. faecalis*.

El efecto antifúngico ha sido revisado por Quintero M. y col (2008)¹⁵ y Rodríguez V. (2005)²¹, quienes comprobaron que es una buena alternativa al tratamiento de la candidiasis oral, al presentar actividad fungicida frente a *C. albicans* y remitir las lesiones características de esta enfermedad.

En periodoncia vemos que propóleo tiene actividad biocida frente a un microorganismo aislado como es *P. gingivalis* según Del Rio P. (2006),³ además se comprobó que es efectivo frente a microorganismos presentes en bolsas periodontales según Speranca P. (2007)¹ y también se ha utilizado propóleo como componente de cremas dentales (Guispert E.-2000)¹⁹ o como enjuagues (Ribeiro A. y col en el 2007),¹⁸ demostrando en ambos casos buenos resultados, así como al compararlo frente a clorhexidina (Ozan F. y col; 2007), quienes demuestran que los preparados de propóleo pueden ser utilizados como enjuague bucal siendo su efecto citotóxico menor.²³

2.2.3.10 EL PROPÓLEO PERUANO (PP)

En nuestro país podemos encontrar diferentes tipos de propóleo de acuerdo a la ubicación geográfica de su producción, donde la altura de la zona de recolección y la escasa o nula contaminación de la región son características que le confieren un valor agregado al PP y teniendo en cuenta la elaboración de propóleo tiene bajo costo de

producción, no interfiere con la cosecha de miel y existe una demanda creciente en el mercado internacional.

Descriptores organolépticos obtenidos a través del análisis sensorial del propóleo en diferentes zonas del Perú.¹⁴

Origen	Aspecto Estructura	Consistencia	Color	Olor	Sabor
Lima	Trozos irregulares, heterogénea sin brillo	Blando-Gomoso	Pardo oscuro intenso	Aromático a resinas y bálsamos	Insípido, indefinido
Arequipa	Trozos irregulares, heterogénea con brillo	Duro-quebradizo	Pardo oscuro intenso	Aromático a resinas y bálsamos	Insípido, indefinido
Piura	Masa compacta homogénea con brillo	Blando-Gomoso	Pardo oscuro	Aromático floral y dulzón recuerda aroma de higo	Insípido, amargo resinoso
Satipo	Masa compacta homogénea sin brillo	Blando-Gomoso	Pardo oscuro	Aromático a resinas y bálsamos	Insípido, indefinido
Lambayeque	Pardo claro, masa heterogénea sin brillo	Muy duro	Pardo-claro	Ligeramente aromático recuerda aroma de especias vegetales	Muy amargo y picante
Ica	Trozos irregulares, opacos, heterogéneos	Blando-Gomoso	Pardo verdoso claro	Aromático a resinas y bálsamos, de eucalipto	Muy amargo resinoso

Propóleo del Valle de Oxapampa, Departamento de Pasco-Perú

El estudio realizado en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (2004), estandarizo el propóleo del valle de Oxapampa del Departamento de Pasco-Perú, basado en los estándares de calidad oficial que existen en Rusia y

Argentina.¹¹ El análisis organoléptico del propóleo del Valle de Oxapampa determinó que cumple con los estándares rusos y presenta las siguientes características:

- **Color:** Pardo rojizo
- **Olor:** Resinoso, balsámico
- **Sabor:** Amargo, fuerte y picante
- **Consistencia:** Rígido a 20 °C y ligeramente maleable a más de 20 °C.

Además se realizó un análisis de su composición lo cual se detalla en la siguiente tabla:

Composición del Propóleo Peruano ¹⁴

	<i>Especificaciones Norma Rusa RST-RSFR 317-77</i>	<i>Promedio de las muestras analizadas</i>
<i>Porcentaje de impurezas</i>	No mayor del 20 %	18,63 %
<i>Reacción cualitativa a la presencia de flavonoides</i>	Detectable	Detectable
<i>Porcentaje de compuestos fenólicos</i>	No menor del 30 %	31 %
<i>Índice de yodo</i>	No menor del 35 %	34,5 %
<i>Porcentaje de cera</i>	No menor del 30 %	29.56 %

2.2.4 CLORHEXIDINA

2.2.4.1 HISTORIA

La clorhexidina se desarrolló en Inglaterra en la década de 1940, inicialmente se comercializó como antiséptico para heridas de piel en

el año 1954. Posteriormente se utilizó en urología cirugía, ginecología, obstetricia, y como sustancia de uso pre quirúrgico de la piel para el personal médico y el paciente. A inicios de 1970 comenzó a utilizarse en odontología como enjuague bucal como agente anti placa y para prevenir la formación de gingivitis. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2 % en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente el desarrollo de gingivitis.⁴³

2.2.4.2 CARACTERÍSTICAS

El gluconato de clorhexidina es una bisguanida dicatiónica, molécula ambifática con grupos hidrófilos e hidrófobos, que posee actividad antibacteriana, baja toxicidad y una fuerte capacidad para adherirse a las mucosas, a la película adquirida y a los microorganismos, las bisguanidas son bactericidas y en su espectro de microorganismos incluye bacterias gram positivas, gram negativas, hongos y levaduras.

2.2.4.3 MECANISMO DE ACCIÓN

El modo de acción se debe a que se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático), en

concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). En boca se adsorbe rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa, después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo.

2.2.4.4 FARMACOCINÉTICA

Aproximadamente el 30 % del principio activo, se retiene en la cavidad oral después del enjuague, la cual se libera lentamente en los fluidos orales. Los niveles plasmáticos de clorhexidina alcanzan un pico de 0,206 pg/g en humanos 30 minutos después de la ingestión de 300 mg de dicho fármaco. No se observan niveles detectables en plasma de clorhexidina después de 12 horas de la ingesta. La excreción de clorhexidina se realiza fundamentalmente por las heces (90 %); menos del 1 % se excreta por la orina.

2.2.4.5 CONCENTRACIÓN

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0,12 % y al 0,2 %, se recomienda realizar un buche con 10 ml de producto a una concentración del 0,2 % y de 15 ml al 0,12 %.

En altas concentraciones se comporta como bactericida, mientras que a bajas concentraciones su acción es bacteriostática.⁴⁴

2.2.4.6 INDICACIONES

Esta indicado como agente antiplaca, para el tratamiento de gingivitis y periodontitis, en cirugía periodontal, como irrigador en alveolitis, como desinfectante en estomatitis por dentaduras (candidiasis subplaca), como tratamiento de ulceraciones aftosas y como coadyuvante en halitosis. Su uso se recomienda dos veces al día, como enjuague oral debe ser usado por lo menos 30 segundos. No se debe ingerir y debe expectorarse después de enjuagarse.

2.2.4.7 EFECTOS ADVERSOS

Su efecto adverso más común es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas sobre todo del dorso de la lengua. La causa por la que la clorhexidina produce tinción no es del todo clara, al parecer se produce una interacción entre la molécula que por un grupo catiónico está unida a la superficie del diente y por el otro grupo e vez de unirse a bacterias se une a sustancias dietéticas ricas en taninos produciéndose una pigmentación. Otro efecto secundario descrito frecuentemente es la alteración del gusto, que podría reducirse evitando enjuagarse con agua después de la aplicación de clorhexidina.

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Anaerobio:** Organismo que se desarrolla en condiciones donde existe una mínima o nula cantidad de oxígeno.
- **Antibacteriano:** Relativo a una sustancia que destruye bacterias o inhibe su crecimiento o reproducción.
- **Antimicrobiano:** Sustancia que impide el desarrollo de los microorganismos: bacterias, hongos, protozoos y virus.
- **Bactericida:** Que destruye o lisa las bacterias.
- **Extracto:** es la sustancia que en forma concentrada se extraerá de otra de la cual conservará sus propiedades esenciales y constitutivas.
- **Extracto etanólico:** Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado.
- **Halo de Inhibición:** zona alrededor de un disco en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen.
- **Bolsa periodontal:** surco gingival profundizado de manera patológica. Se clasifican en supraóseas e infraóseas, según se encuentren por encima o por debajo del hueso alveolar.

2.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica?

2.5 JUSTIFICACIÓN

La periodontitis crónica es muy frecuente en la práctica profesional, el tratamiento coadyuvante al debridamiento mecánico es el uso de antimicrobianos, los cuales han demostrado mediante las investigaciones su acción frente a diversos microorganismos causantes de enfermedades en cavidad oral. Sin embargo son también muy conocidos los efectos adversos a largo plazo que se pueden originar por el uso indiscriminado de estos mismos. Es por ello que el presente trabajo pretende determinar si el extracto etanólico de propóleo peruano, obtenido del Valle de Oxapampa, logra mostrar una acción antibacteriana sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, para luego compararla con uno de los antimicrobianos más usados en la práctica diaria como es la clorhexidina 0,12 % con la finalidad de demostrar que su uso puede lograr buenos resultados, para disminuir así el uso de soluciones químicas y proponer en el futuro una alternativa en el tratamiento coadyuvante con el empleo del propóleo dentro de colutorios y pastas, a fin de tratar una de las enfermedades más prevalentes del sistema estomatognático como es la enfermedad periodontal.

2.6 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.6.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

2.6.2 Objetivos Específicos

- Medir el diámetro del halo de inhibición del EEPP sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- Medir el diámetro del halo de inhibición de clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- Medir el diámetro del halo de inhibición del alcohol sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- Comparar el promedio de los diámetros de halo de inhibición del EEPP y clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- Comparar el promedio de los diámetros de halo de inhibición del EEPP y alcohol sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

2.7 HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.7.1 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

- Existe actividad antibacteriana *in vitro* del EEPP sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

HIPÓTESIS ESPECÍFICA

- La actividad antibacteriana *in vitro* del EEPP es mayor que la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- La actividad antibacteriana *in vitro* del EEPP es mayor que el alcohol sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

2.7.2 VARIABLES

- **Variable independiente:** Sustancias antimicrobianas: EEPP y clorhexidina 0,12 %
- **Variable dependiente:** Actividad antibacteriana

2.7.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA	VALOR
SUSTANCIA	Soluciones a determinada concentración	EEPP	Solución al 30 %	Cuantitativa	%
		clorhexidina 0,12%	Solución al 0,12 %	Cuantitativa	%
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	Capacidad inhibitoria del crecimiento de bacterias anaerobias aisladas de pacientes con PC por acción de las sustancias en estudio		Diámetro del halo de inhibición	Cuantitativa	mm

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

- Según análisis y alcance de los resultados: EXPERIMENTAL *IN VITRO*
- Según el periodo y secuencia del estudio: LONGITUDINAL.

3.2 Población y Muestra

3.2.1 Población

Pacientes con diagnostico de periodontitis crónica de la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM.

3.2.2 Muestra

3.2.2.1 Tamaño de la muestra

El tamaño fue de 15 muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica.

3.2.2.2 Criterios de Inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica.

3.2.2.3 Criterios de Exclusión:

- Pacientes que presenten enfermedad sistémica.
- Pacientes bajo tratamiento médico.

3.2.2.4 Tipo de muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico intencional, debido a que antes de tomar las muestras de los pacientes, se verificó si estos cumplían los criterios de inclusión y exclusión.

3.2.2.5 Unidad de Análisis

Placas de agar Schaedler con cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

3.3 MATERIALES

- 30ml de Extracto etanólico de propóleo
- 30ml de clorhexidina 0,12 %
- Alcohol 96°
- Medios de siembra y cultivo: Agra Schaedler y caldo tioglicolato
- Conos de papel, mechero.
- Guantes, mascarilla, campos.
- Torundas de algodón y gasas
- Equipos de diagnóstico

3.4 MÉTODOS

3.4.1 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

Selección de pacientes:

La población de pacientes que asistieron a consulta en la Clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNMSM, durante el mes de junio del año 2010, se eligieron 15 pacientes adultos, entre 39 y 69 años de edad, de los cuales 8 fueron mujeres y 7 hombres, todos ellos con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica; cada paciente fue informado sobre el proyecto de investigación y procedió a firmar la hoja de consentimiento informado.

Para la toma de muestra:

Se revisó la Historia Clínica (periodontograma) de cada paciente, seleccionando la pieza dentaria con mayor profundidad de sondaje. Se eliminó cuidadosamente la placa supragingival con la ayuda de torundas de algodón, se procedió a colocar una punta de papel Nº 30 dentro del saco periodontal durante 30 segundos, procurando no alterar la forma del cono de papel. Se retiró la punta y se recolectó en medios de transporte de caldo de tioglicolato para mantener la viabilidad del microorganismo, se llevó al laboratorio para su procesamiento.

Sustancias:

El extracto etanólico de propóleo peruano, cuya concentración es de 30 % fue adquirido, de la casa comercial “Productos Frey”, en el

Departamento de Cerro de Pasco-Perú. Se utilizó como el positivo la clorhexidina 0,12 % y el negativo fue alcohol de 96°.

Prueba de Actividad Antibacteriana

La prueba de susceptibilidad antibacteriana se realizó por el método de difusión en discos, la cual se detalla a continuación:

- Una vez obtenida la muestra, esta fue transportada al laboratorio en frascos de tioglicolato para su incubación por 24 horas.
- Se utilizó como medios de cultivo el agar Schaedler, para bacterias anaerobias, se marcó en la base de la placa puntos debidamente rotulados que indicaron la posición de los discos y el tipo de solución para cada uno. Así mismo se enumeró cada placa con números arábigos del 1 al 15 en relación al número de muestras tomadas.
- Se procedió a la dilución de la muestra utilizando suero fisiológico estéril, cuya turbidez de la suspensión se ajustó al estándar 0.5 de la escala de McFarland.
- El inóculo para la siembra se obtuvo con el hisopo embebido en la suspensión del tubo preparado y se sembró sobre la superficie del agar Schaedler, hasta obtener una distribución uniforme del inóculo.
- Luego se colocaron con pinza estéril los discos embebidos en cada una de las soluciones sobre la superficie del medio.

- Antes de colocar las placas en la jarra de anaerobiosis, se dejó reposar por unos minutos y se incubó durante 48, para luego proceder a la lectura.

3.4.2 Recolección de Datos

Se midió el diámetro de los halos de inhibición con un calibrador, debidamente milimetrado en la base de la placa y se registraron los datos en una ficha de recolección de datos.

Análisis de resultados

Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se midieron y compararon los diámetros de halo de inhibición, entre los grupos que presentaban EEPP y clorhexidina 0,12 %.

El análisis se realizó con Software SPSS v15. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de la distribución de los datos, así como también prueba de Levene para verificar la homogeneidad. Para establecer si hubo diferencias de los halos de inhibición por solución se utilizó la prueba de Anova. Se aplicó la prueba de Bonferroni de comparaciones múltiples entre el grupo de estudio (EEPP), el grupo de control positivo (clorhexidina 0,12%) y de control negativo (alcohol), a fin de evaluar las diferencias significativas que puedan existir en relación al promedio del diámetro de inhibición.

RESULTADOS

En la figura 1. Se observa los promedios del halo de inhibición de las soluciones experimentales. El menor promedio del halo de inhibición corresponde al alcohol (6,8 mm), seguido de la clorhexidina 0,12 % (11,87 mm) y EEPP (16,73 mm), con un intervalo de confianza del 95 %.

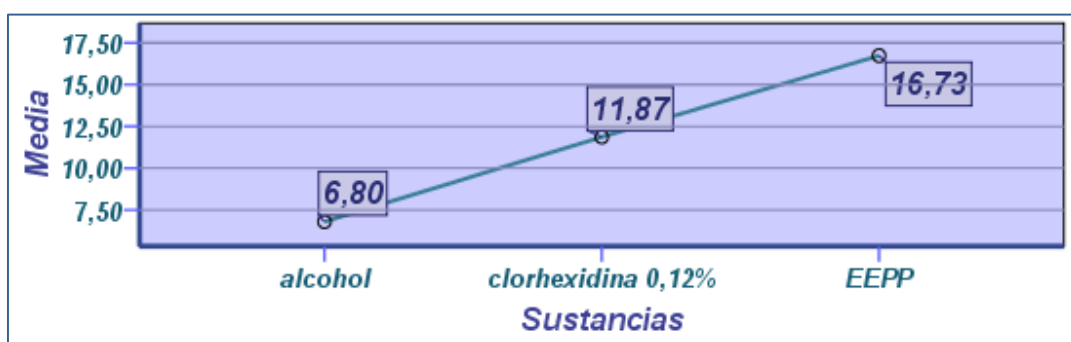


Figura 1. Promedio del halo de Inhibición de las diferentes concentraciones de EEPP

Se realizó la prueba de Anova one way, entre el EEPP y las soluciones de control (clorhexidina 0,12 % y alcohol), obteniéndose un valor ($p < 0.05$), por tanto existe diferencia significativa entre ellos.

La prueba de Bonferroni, demuestran la comparación múltiple entre el EEPP, clorhexidina 0,12 %, y alcohol. (Cuadro 1.)

Cuadro1. Diferencias entre la actividad antibacteriana promedio del EEPP y las soluciones de control

<i>Sustancia (I)</i>	<i>Sustancia (J)</i>	<i>Diferencia de medias (I-J)</i>	<i>p</i>
<i>alcohol</i>	clorhexidina 0,12%	-5,07	0,00
	EEPP	-9,93	0,00
<i>clorhexidina 0,12%</i>	alcohol	5,07	0,00
	EEPP	-4,87	0,00
<i>EEPP</i>	alcohol	9,93	0,00
	clorhexidina 0,12%	4,87	0,01

En la comparación por pares entre el EEPP y clorhexidina 0,12 % ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 4,87 mm a favor del propóleo.

En la comparación por pares entre el EEPP-alcohol ($p < 0.05$); por tanto no tienen similar actividad antibacteriana, con una diferencia de media de 9,93 mm a favor del propóleo.

DISCUSIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa resultante de la inflamación de los tejidos de soporte dental, causados por diversos factores, principalmente el sobrecrecimiento de especies patógenas por encima de un umbral específico. En el tratamiento de la periodontitis crónica, el debridamiento mecánico y la instauración de medidas de control de placa bacteriana, son apoyados con el uso de antisépticos como clorhexidina, durante las primeras fases de la terapia periodontal, debido a la actividad antibacteriana que ella presenta.

Diversos criterios acerca del uso de clorhexidina en el tratamiento de las enfermedades periodontales se han manifestado debido a los efectos adversos que han producido en el paciente, de tal manera que se terminan cambiando los esquemas terapéuticos, con la finalidad de buscar aquel que tenga la mayor eficiencia sin causar daño a largo plazo.

El importante crecimiento mundial de la fitoterapia ha estimulado la investigación en odontología con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de plantas con el objeto de ayudar en el control de la placa bacteriana, y por consiguiente, en la disminución de la incidencia de caries y enfermedad periodontal.

La actividad antimicrobiana del propóleo contra un amplio rango de microorganismos patógenos como bacterias, hongos, levaduras y los

virus, se investiga en diversos países de América y Europa. En el Perú, en el año 2004, se realizó un estudio por López – Ubillus¹¹ para estandarizar el propóleo proveniente del valle de Oxapampa, y determinaron que cumple con los parámetros de calidad basadas en la Norma Rusa RST – RSFR – 317–77 (ANEXO 3).

Para confirmar la presencia de flavonoides que le da propiedad antibacteriana al propóleo se analiza una muestra del EEPP, a fin de conocer si la descripción de las características físicas y la presencia de Flavonoides corresponden o son similares al estudio acerca de la estandarización del propóleo del Valle de Oxapampa. Los resultados confirmaron la presencia de flavonoides en la muestra enviada así como de las características descritas. (ANEXO 4)

Se comprobó la actividad antibacteriana *in vitro* del EEPP sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, obteniendo además que la acción de la clorhexidina 0,12 % fuera menor que el EEPP.

La susceptibilidad de las bacterias periodontopatógenas es consistente con los hallazgos de autores como: Speranca P(2007);¹ que comprobó la actividad antimicrobiana del EAP al 5, 10, 20, 30 % sobre microorganismos de bolsas periodontales; Rodríguez M (2007);⁹ que demostró mayor actividad biocida del propóleo sobre *P. gingivalis*, *P. intermedia*, que el paramonoclorofenol alcanforado; Del Rio P (2006),³ que

estudio la acción de un propóleo chileno sobre *Porphyromonas gingivalis*; Cairo y col (2006),¹⁶ demostraron la eficacia de un gel de propóleo brasileño en el tratamiento de la gingivitis y periodontitis crónica; Guevara et al (2002),² quienes determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo brasileño contra seis cepas bacterianas estandarizadas periodontopatógenas como *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*.

La actividad antibacteriana que ha demostrado el EEPP sobre cultivos *in vitro* de bacterias anaerobias se debe a la acción de los flavonoides como quercetina, pinocembrina y galangina, además del ácido cafeico, benzoico y cinámico, los cuales actúan sobre la membrana bacteriana o pared celular causando daños funcionales y estructurales. Así mismo de acuerdo con De Paula y col. (2006)¹³ se confirma que el mecanismo de acción se debe más al efecto sinérgico de sus componentes que al de sus fracciones individuales. Estudios como los de Ozen y col. (2010)⁴; Koru y col. (2007)⁵ observaron diferencias con respecto al origen geográfico de las muestras de propóleo y ratificaron que la actividad antimicrobiana puede variar dependiendo de su procedencia.

Teniendo en cuenta la aceptación que existe por la medicina natural por parte de la población, el estudio permite valorar la actividad antibacteriana

del Extracto Etanólico de Propóleo Peruano frente a microorganismos frecuentes en la enfermedad periodontal, de modo que de acuerdo a los resultados finales se puede optar medidas de prevención y/o tratamiento que incluyan al propóleo dentro de pastas o colutorios, no sin antes realizar estudios sobre modelos in vivo, porque el laboratorio no semeja las condiciones que se presenta en la cavidad bucal durante el curso y tratamiento de la enfermedad periodontal.

CONCLUSIONES

- El EEPP presenta actividad antibacteriana *in vitro* sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- La actividad antibacteriana del EEPP es mayor que la actividad antibacteriana de la clorhexidina 0,12 % por lo que se concluye que es más efectivo sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- La actividad antibacteriana del EEPP es mayor que la actividad antibacteriana del alcohol por lo que se concluye que es más efectivo sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con mayor número de ensayos así como con otras bacterias patógenas, causantes de infecciones de cavidad bucal.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del EEPP.
- Realizar investigaciones con soluciones de EEPP a mayores concentraciones del 30 % a fin de conocer si existe una relación directamente proporcional a su concentración.
- Realizar estudios in vivo del EEPP en pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal a fin de verificar si los resultados *in vitro* son similares.
- Estudiar la posibilidad de acción sinérgica entre el EEPP y clorhexidina.
- Ampliar la investigación acerca de formulaciones de pastas y colutorios dentales con EEPP.
- Realizar estudios con extracto de propóleo de diversas regiones del Perú y comparar la actividad antibacteriana entre ellos.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) sobre cultivos *in vitro* de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, tomando como control positivo a la clorhexidina 0,12 %. Se seleccionaron 15 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, que acudieron a atenderse en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se procedió a tomar la muestra con conos de papel numero 30 y se colocó dentro del saco periodontal durante 30 segundos, luego se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Se utilizó el método de difusión en discos con las soluciones experimentales y se incubó en condiciones de anaerobiosis, por 24h y 48h a 37° C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. De los resultados se comprobó que existe una mayor actividad antibacteriana del EEPP que la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

PALABRAS CLAVES: PERIODONTITIS, PROPÓLEO, ANAEROBIOS, CLORHEXIDINA.

ABSTRACT

The purpose of this study was to demonstrate the antibacterial effect of ethanol extract of Peruvian propolis in vitro, against anaerobic bacterias of patients with chronic periodontitis. 0,12% Clorhexidine was used as a positive control. 15 patients were evaluated, they had clinical and radiographic diagnose of chronic periodontitis and were treated at the Faculty of Odontology of Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM – Lima – Perú). The sample was obtained using No. 40 absorbent paper cones inserted into the periodontal pocket of the patients for 30 seconds and processed in the Microbiology's laboratory. A disk-diffusion method was used, the samples were incubated in anaerobiosis, at 37° for 24 and 48 hours. The diameter of inhibition zones were measured and it was found that there is a higher antibacterial activity of ethanol extract of Peruvian propolis than 0,12% Clorhexidine, against anaerobic bacterias of patients with chronic periodontitis.

KEY WORDS: Periodontitis, Propolis, Anaerobic, Clorhexidine.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Speranca P, Maia L, Toscano T, Florencio W. Verificacao da atividade antimicrobiana de solucoes a base de própolis, sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais - Estudo *in vitro*. Rev. de Periodontia 2007; 17(3):54-59.
2. Gebara E, Lima L, Mayer M. Propólis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. Brazilian Journal of Microbiology 2002; 33:365-369
3. Del Rio P. Actividad biocida de un propólis chileno frente a *Porphyromona gingivalis*: estudio *in vitro*. [tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; 2006.
4. Ozen T. y col. *In vitro* Activity of Turkish Propólis Samples Against Anaerobic Bacteria Causing Oral Cavity Infections. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010; 16(2): 293-298
5. Koru O. y col. Actividad Antimicrobiana *In vitro* de Muestras de Propóleos de Diferentes Orígenes Geográficos contra ciertos Patógenos Orales. Departamento de la microbiología, división de Parasitología Médica, escuela médica militar de la academia de Gulhane de la medicina, 06018 Ankara, Turquía. [Anaerobe](#) 7 Mar 2007.
6. Duarte S y col. Efecct of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococcus. Biol. Pharm. Bull. 2003; 26 (4): 527-531.

7. Da Silva G, Ribeiro L, Pimenta F, Baroni D. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: A preliminary study. *Journal of Brazil Dentistry* 2008; 19(4):301-305.
8. Sanchez A, Maia C, Santos E. Addition of propolis to calcium hydroxide and its influence on antibacterial action. *Ciencia Odontológica de Brasil* 2008; 11(3): 81-86.
9. Rodríguez M. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical. [tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
10. Awawdeh L, Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Australian Endodontic Journal* 2009; 35:52-58.
11. López J, Ubillús M. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, Departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. [tesis] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
12. Tomaz R, Rosa K, Cortes M, Rodriguez V. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. *Brazil Journal Oral Science* 2007; 6(22): 1387-1391.
13. De Paula A y col. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to Brazilian green propolis extract. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 467-473
14. Eguizábal M. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*.

[Tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.

- 15.Quintero M. y col. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Cándida albicans*. *Rev Iberoamericana de Micología* 2008; 25: 22-26.
- 16.Cairo R. y col. periodontitis Treatment With Brazilian Green Propolis Gel. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 336-341
- 17.Carvalho S, Guedes A, Mendes F. Effect of a propolis extracto on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *Journal of Applied Oral Science* 2007; 15 (5): 420-3.
- 18.Ribeiro A. y col. Atuacao clínica e microbiológica da solucao de própolis para bochecho em crianças cariem ativas. *Archivos em Odontología* 2007; 43(3): 60-66.
- 19.Gispert E, Cantillo E, Rivero A, Illance M. Actividad anticaries de una crema dental con Propóleos. *Rev. Cubana Estomatolo* 2000; 37 (3): 166-70.
- 20.Rodriguez V. y col. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytotherapy Research* 2008; 22: 1544-47.
- 21.Rodríguez V. y col. Oral Candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytotherapy Research* 2005; 19: 652-654.
- 22.Fernandez K, Martin O, Arias S, Paz E. Eficacia de la tintura de propóleo al 20% en el tratamiento de la hiperestesia dentinaria. *Archivo Médico de Camaguey* 2007; 11 (5).

23. Ozan F. y col. Efecto of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. *European Journal of Dentistry* 2007; 1: 195-201.
24. Mayorga I. y col. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. *Biomédica* 2007; 27: 21-33
25. Guilarte C, Perrone M. Detección de especies de bacilos anaerobios Gram negativos en pacientes con periodontitis crónica. *Rev. Acta Odontológica Venezolana* 2007; 45 (1)
26. Cabrera M. Estudio microbiológico de la bacteria *Prevotella intermedia* en el surco gingival de gestantes con diferentes grados de placa bacteriana- Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé [Tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004
27. Lindhe J. Periodontología clínica e Implantología odontológica. 4ta ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2005.
28. Joachin A. Prevalencia, Severidad, Extensión, Características Clínicas de la Enfermedad Periodontal y Presencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y/o *Porphyromonas gingivalis* en Escolares de 13 a 21 años de la República de Guatemala, año 2007. [Tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala; 2007.
29. Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología* 2005; 17(2): 79-87.

30. Escudero N, Perea M, Bascones A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. Avances en Periodoncia e Implantología 2008; 20(1): 27-37
31. Bascones A, Figuero E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Medicina y Patología Oral 2004; 9 Suppl: 92-107
32. Lafaurie G y col. Estudios Epidemiológicos de la prevalencia de microorganismos periodontopáticos en periodontitis crónica y agresiva. Revista Científica, 2004; 10(1): 80-91
33. Araujo M, Sukekava F. Epidemiology of periodontal disease in Latin America. Revista Periodontia, 2007; 17:07-13.
34. Otero J, Proaño D. Prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y necesidad de tratamiento en el personal de tropa masculino en Servicio Militar en Lima en el año 2000. Revista Estomatológica Herediana 2005; 15(1): 11 -17
35. Liébana J, Castillo A, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. Medicina y Patología Oral 2004; 9 Suppl: 75-91
36. Guilarte C, Perrone M. Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. Acta Odontológica Venezolana 2004; 42(3).
37. Liebana J. Microbiología Oral. 1ra Edición. España. Interamericana Mc Hilla Graw. 1999.
38. Bascones A, Caballero A. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas Gingivalis* como principales patógenos periodontales. Avances en Periodoncia, 2000; 12(2): 69-75

- 39.Rodríguez A, Rodríguez M. Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica. *Revista Terapeutica* 2009; 33(3): 67-79
- 40.Banskota A, Tezuda Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 2001; 15: 561-571.
- 41.Farre R, Frasquet I, Sánchez A. El propólis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 2004; 45(1):21-43.
- 42.Martos M, Ruiz I, Fernández J, Pérez J. Functional Properties of Honey, Propólis and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 2008; 73(9): 117-124
- 43.Bascones A, Morante S. Antisépticos orales: Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances en Periodoncia* 2006; 18(1): 31-59.

ANEXOS

ANEXO 1

N.º _____

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPÓLEO
PERUANO FRENTE A BACTERIAS ANAEROBIAS FRECUENTES EN PERIODONTITIS
CRONICA”

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

1. NOMBRE DEL PACIENTE: _____
2. Nombre del Operador: _____
3. EDAD: _____ años

ENTREVISTA

No de Pieza: _____

Profundidad de sondaje: _____

- | | | | | |
|--|----|--------------------------|----|--------------------------|
| 4. Presenta enfermedad sistémica: | Sí | <input type="checkbox"/> | No | <input type="checkbox"/> |
| 5. Está recibiendo terapia antibiótica o antiinflamatoria: | Sí | <input type="checkbox"/> | No | <input type="checkbox"/> |

OBSERVACIONES:

ANEXO 2

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Facultad de Odontología

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la investigación: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPÓLEO PERUANO SOBRE CULTIVOS DE BACTERIAS ANAEROBIAS FRECUENTES EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA.

Investigador: Reyes Collahuacho Carmen Victoria

La presente investigación consiste en determinar la actividad antibacteriana de una solución de extracto etanólico de propóleo frente a bacterias anaerobias más prevalentes en la enfermedad periodontal y a la vez comparar su efecto con la clorhexidina 0,12 %. Para poder realizar este objetivo se tomara muestras de placa subgingival de bolsas periodontales. De los resultados que se obtengan, se podrá platear a futuro una medicación alternativa a base de propóleo como sustancia natural evitando así el daño de las sustancias químicas empleadas hasta la fecha e el tratamiento de apoyo. La información registrada es confidencial, sin revelar la identidad de los participantes.

Por el presente documento, Yo
he leído y entendido en que consiste la investigación y acepto libre y voluntariamente participar en él.

Lima,..... de..... del.....

Firma

DNI:.....

ANEXO Nº 3 : NORMA RUSA RST – RSFR – 317 – 77

DENOMINACIÓN DE LOS INDICES	VALORES ACEPTADOS
ASPECTO EXTERNO	Pelotas, granos o briquetas
COLOR	Verde oscuro, pardo o gris con matices verde, amarillo, castaño oscuro o rojo
OLOR	Característico resinoso, aromático (la mezcla de olores de la miel de las hierbas aromáticas, del pino y del álamo)
SABOR	Amargo, algo fuerte
ESTRUCTURA HETEROGENEA	Espesa, con deformaciones
CONSISTENCIA	De 20° C a 40° C es viscoso A menos de 20° C es dura
CERA	No más del 30%
INDICE DE OXIDACIÓN	No mayor de 22 segundos
REACCION CUALITATIVA ANTE LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES	Positiva
MEZCLA MECÁNICA	No más del 20%
COMPUESTOS FENOLICOS	No menos del 30%
INDICE DE IODO	No menor de 35%

ANEXO 4: ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO PERUANO

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS <i>(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)</i> FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA CENPROFARMA CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO	
---	---	---

PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º143-CPF-2010

ORDEN DE ANALISIS	: 00130/2010
SOLICITADO POR	: CARMEN REYES CALLAHUACHO
MUESTRA	: EXTRACTO DE PROPOLEO
CANTIDAD	: Viales x 10 mL
FECHA DE RECEPCIÓN	: 12 de abril del 2010

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
APARIENCIA		Líquido homogéneo, libre de partículas.
COLOR		Marrón Oscuro
OLOR		Aromático a miel de abejas
CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (EXPRESADOS COMO QUERCETINA)		7.35 mg/mL

Lima, 23 de abril del 2010.



Mg. Mirtha Roque Alcarraz
 Directora del Centro de Control Analítico

F/CCA-009_R1

FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO

Jr. Puno 1002, Jardín Botánico Lima 1 - Perú. Tel: (511) 328-4737 Anexo 18. Telefax 328-7398 - Ap. Postal 1760 - Lima 1
 E-mail: cenprofarma@unmsm.edu.pe <http://www.unmsm.edu.pe/farmacia>

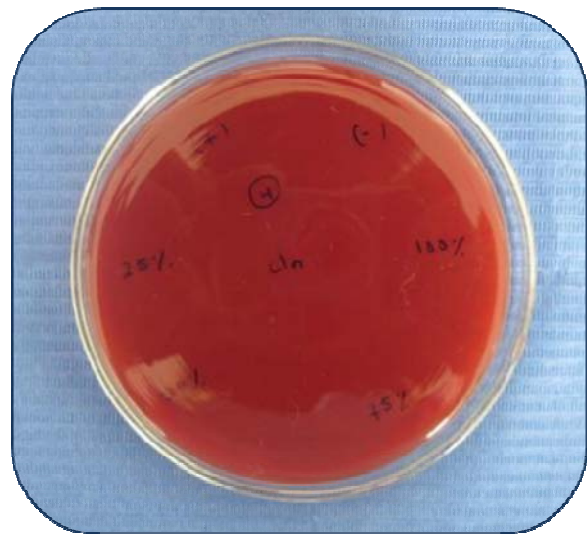
**ANEXO 5: HALO DE INHIBICIÓN EN MM DE DIÁMETRO DEL EXTRACTO DE
PROPÓLEO EN AGAR SCHAEDLER**

Numero muestra	Control (-)	clorhexidina	EEPP
1	8	15	18
2	10	15	20
3	8	16	18
4	6	11	18
5	6	11	16
6	6	12	16
7	6	11	11
8	5	12	17
9	7	10	16
10	6	11	16
11	8	12	20
12	6	12	18
13	6	7	16
14	6	7	15
15	8	16	16

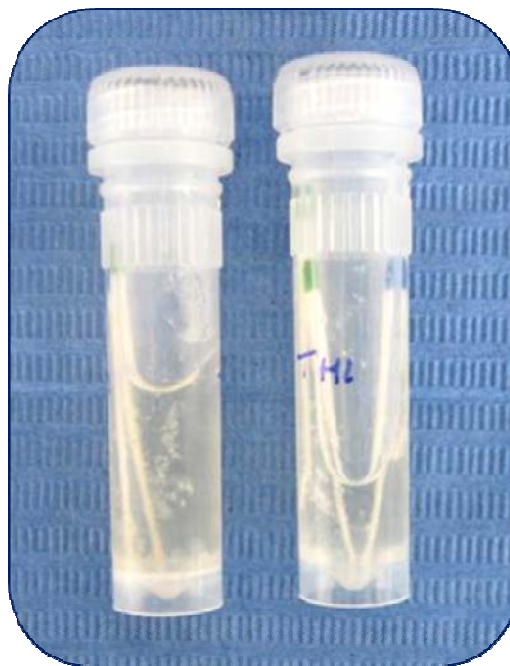
ANEXO 6: MATERIALES Y MUESTRAS



PROPÓLEO



PLACAS CON AGAR SCHAEGLER



MUESTRA DE PLACA SUBGINGIVAL EN TIOGLICOLATO

ANEXO 7: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

SIEMBRA DE LA MUESTRA EN AGAR SCHAEGLER



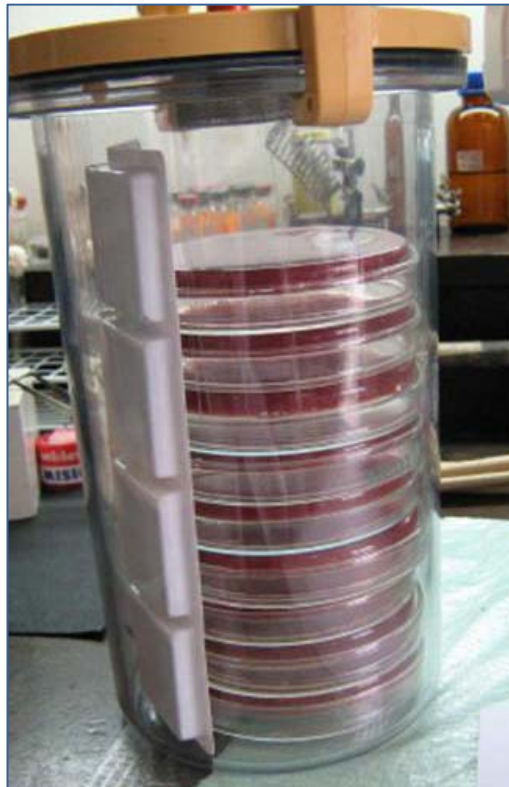
COLOCACIÓN DE LOS DISCOS ESTÉRILES



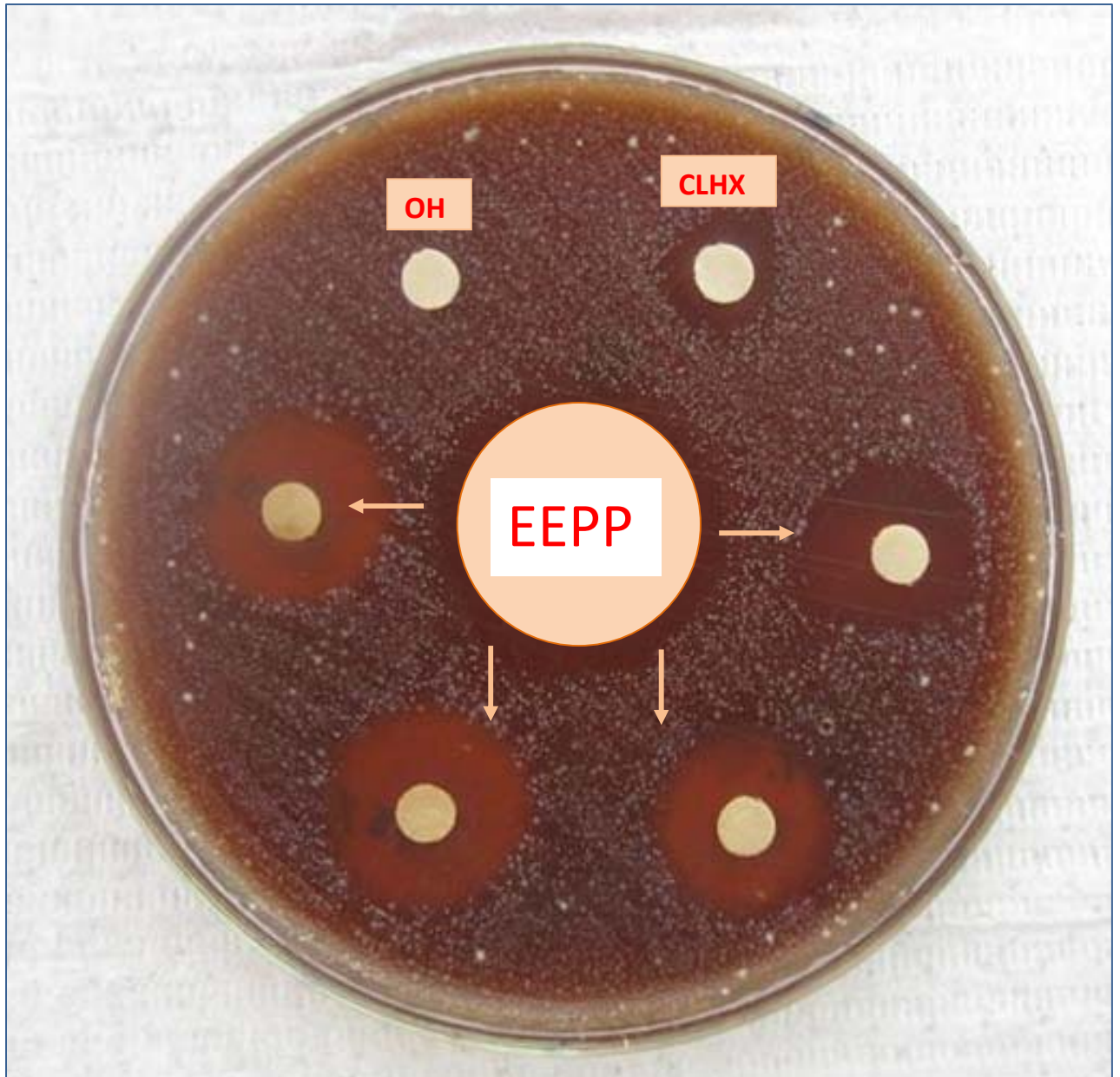
APLICACIÓN DE LAS SOLUCIONES EXPERIMENTALES



JARRA DE ANAEROBIOSIS



HALOS INHIBITORIOS DE LAS SOLUCIONES EXPERIMENTALES



-
- ¹ Speranca P, Maia L, Toscano T, Florencio W. Verificacao da atividade antimicrobiana de solucoes a base de propolis, sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais - Estudo *in vitro*. Rev de Periodontia 2007; 17(3):54-59.
- ² Prop enbat period
- ³ Del Rio P. Actividad biocida de un propolis chileno frente a Porphyromonas gingivalis: estudio *in vitro*. [tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; 2006.
- ⁴ *In vitro* Activity of Turkish Propolis Samples Against Anaerobic Bacteria Causing Oral Cavity Infections
- ⁵ turquia
- ⁶ Duarte S y col. Efecct of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococcus. Biol. Pharm. Bull. 2003; 26 (4): 527-531.
- ⁷ Da Silva G, Ribeiro L, Pimenta F, Baroni D. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes whith propolis extracts and calcium hidroxide: A preliminary study. Journal of Brazil Dentistry 2008; 19(4):301-305.
- ⁸ Sanchez A, Maia C, Santos E. Addition of propolis to calcium hydroxide and its influence on antibacterial action. Ciencia Odontologica de Brasil 2008; 11(3): 81-86.
- ⁹ Rodriguez M. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical. [tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
- ¹⁰ Awa)wdeh L, Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and hidroxide as a short-term intracanal medicament against Enterococcus faecalis: A laboratory study. Australian Endodontic Journal 2009; 35:52-58.
- ¹¹ Lopez J, Ubillús M. Estandarizacion del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. [tesis] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
- ¹² Tomaz R, Rosa K, Cortes M, Rodriguez V. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. Brazil Journal Oral Science 2007; 6(22): 1387-1391.
- ¹³ prop
- ¹⁴ Eguizabal M, Moromi H. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus casei. Odontologia Sanmarquina 2007; 10(2): 18-20.
- ¹⁵ Quintero M. y col. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de Apis mellifera sobre el crecimiento *in vitro* de Candida albicans. Rev Iberoamericana de Micología 2008; 25: 22-26.
- ¹⁶ Tto propóleo
- ¹⁷ Carvalho S, Guedes A, Mendes F. Effect of a propolis extracto on Streptococcus mutans counts in vivo. Journal of Applied Oral Science 2007; 15 (5): 420-3.
- ¹⁸ Ribeiro A. y col. Atuacao clínica e microbiológica da solucao de propolis para bochecho em crianças carie ativas. Archivos em Odontologia 2007; 43(3): 60-66.
- ¹⁹ Gispart E, Cantillo E, Rivero A, Illance M. Actividad anticaries de una crema dental con Propóleos. Rev Cubana Estomatolo 2000; 37 (3): 166-70.
- ²⁰ Rodriguez V. y col. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. Phytotherapy Research 2008; 22: 1544-47.
- ²¹ Rodriguez V. y col. Oral Candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. Phytotherapy Research 2005; 19: 652-654.
- ²² Fernandez K, Martin O, Arias S, Paz E. Eficacia de la tintura de propóleo al 20% en el tratamiento de la hiperestesia dentinaria. Archivo Médico de Camaguey 2007; 11 (5).
- ²³ Ozan F. y col. Efecct of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. European Journal of Dentistry 2007; 1: 195-201.
- ²⁴ Mayorga I. y col. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. Biomédica 2007; 27: 21-33
- ²⁵ Guilarte C, Perrone M. Detección de especies de bacilos anaerobios Gram negativos en pacientes con Periodontitis crónica. Rev. Acta Odontológica Venezolana 2007; 45 (1)

-
- 26 Cabrera M. Estudio microbiológico de la bacteria *Prevotella intermedia* en el surco gingival de gestantes con diferentes grados de placa bacteriana-Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé. [tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004
- 27 Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. 4ta ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2005.
- 28 Joachin A. Prevalencia, Severidad, Extensión, Características Clínicas de la Enfermedad Periodontal y Presencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y/o *Porphyromonas gingivalis* en Escolares de 13 a 21 años de la República de Guatemala, año 2007. [Tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala; 2007.
- 29 Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología* 2005; 17(2): 79-87.
- 30 Revisión pec
- 31 clasificación
- 32 Estudios epidemiológicos
- 33 revista
- 34 Otero J, Proaño D. Prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y necesidad de tratamiento en el personal de tropa masculino en Servicio Militar en Lima en el año 2000. *Revista Estomatológica Herediana* 2005; 15(1): 11 -17
- 35 Tto atb de infecciones odontogénicas
- 36 Ep consideraciones microbiológicas
- 37 Mo relacionados con etiología
- 38 Liebana libro
- 39 Aay pg
- 40 Banskota A, Tezuda Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 2001;15: 561-571.
- 41 El propólis y la salud
- 42 Propiedad del propóleo, jalea y miel
- 43 Olate S, Soto M. Antimicrobianos locales en Periodoncia: Revisión de la literatura. *Acta odontológica Venezolana* 2007; 45(3).
- 44 Antisépticos